

平成18及び19年度における北海道産加工食品中の アレルギー物質のモニタリング検査について

The Monitoring Test for Allergenic Substances in Processed Foods
Produced in Hokkaido in Fiscal Years 2006 and 2007

兼俊 明夫 林 隆章 平間 祐志 加藤 芳伸
鈴木 智宏 孝口 裕一 小川 広

Akio KANETOSHI, Takaaki HAYASHI, Yuji HIRAMA, Yoshinobu KATO,
Tomohiro SUZUKI, Hirokazu KOUUCHI and Hiroshi OGAWA

Key words : food allergy (食物アレルギー) ; processed food (加工食品) ; ELISA (エライザ法) ;
PCR (PCR 法) ; western blotting (ウェスタンブロット法)

食物アレルギーによる健康被害は深刻な社会問題となっており¹⁻³⁾, アトピー性皮膚炎の発症にもその関与が示唆されている⁴⁾。また, 児童の成長期においては, 食物アレルギーにより必須栄養素の摂取が抑制されることがあるため, 栄養障害につながる恐れが懸念されている⁵⁾。

平成13年3月, 厚生労働省は, アレルギー物質を含む食品について, 消費者の健康被害の発生を防止する観点から, 特定原材料5品目(小麦, そば, 落花生, 卵, 乳)を含む食品には特定原材料を含む表示を義務化することを関係機関等に通知した⁶⁾。さらに, 平成14年11月には特定原材料5品目を含む食品の検査法を通知した⁷⁾。

北海道は, 平成16年度より, 道内で製造された加工食品におけるアレルギー物質のモニタリング検査を実施している。著者らは平成16年度及び17年度に実施した検査で陽性と確認された事例が表示義務に対する認識の欠如や製造工程における混入によるものであることを報告した⁸⁾。今回は平成18及び19年度に行った検査についてその結果を報告する。

方 法

1. 試験品

北海道各支庁保健福祉事務所管内で製造された加工食品を対象として, 管内製造工場にて平成18年度は40検体を, 平成19年度は38検体をそれぞれ, 収去して試験品とした。これらの試験品の中で要冷凍・要冷蔵のものについては, データロガー等の温度記録装置を同封して搬送中の温度管理を行った。

2. ELISA 測定用キット

特定原材料5品目(小麦, そば, 落花生, 卵, 乳)の混入の有無を判定する一次スクリーニング法には, これらの精製タンパク質もしくは複合タンパク質を抗原として作成された抗体を使用したELISA法を用いた。一次スクリーニング試験のELISA法には, 厚生労働省通知による改良検査法⁹⁾(以下通知法と略)として新たに加えられた, 森永生科学研究所製モリナガFASPET特定原材料測定キット(以下モリナガと略記)の小麦グリアジン, そば, 落花生, 卵白アルブミン, カゼイン検出用, 及び日本ハム(株)中央研究所製日本ハムFASTKITエライザVer.-IIシリーズキット(以下日ハムと略記)の小麦, そば, 落花生, 卵, 牛乳検出用キットを用いた。

3. 試料溶液の調製及び測定法

試料溶液の調製と測定は通知法⁹⁾に従って行った。最初に試験品をフードプロセッサー(松下産業(株)製, MK-K78)またはホモジナイザー(日本精機(株)製, AM-11)を用いて均質化した。その試料約1gを50mLの共栓付きディスポーザブル遠沈管に精秤し, 19mLの抽出液(ELISAキットの3液を混合して調製)を加えてpHを6.0~8.0に調整後, 水平状態に固定し, 1分間あたり90~110往復, 室温(20~25℃)で18~20時間振とうして抗原タンパク質の抽出操作を行った。

抽出液は遠心分離(3000×g, 20分間)し, 上清をろ紙(5A, 110mm)でろ過して試料溶液とした。さらに, 試料溶液は, 検体希釈液で20倍に希釈し, ELISA法用96穴マイクロプレートに負荷した。マイクロプレートには, 1次抗体, 2次抗体, 発色基質などを順次反応させ, バイオ・

ラッド社製 Foodmark マイクロプレートリーダーにて吸光度測定を行い、4 係数 Logistic 解析用データ解析ソフト Foodmark Software (バイオ・ラッド社製) にて特定原材料由来タンパク質含有量を算出した。特定原材料由来のタンパク質含有量が、検量線下限値 (モリナガ, 日ハム共に: $0.3 \mu\text{g/g}$) 未満を「検出せず」とし、 $10 \mu\text{g/g}$ 以上を「陽性」と判定した。

4. 確認試験法

一次スクリーニング試験の ELISA 法にて、 $10 \mu\text{g/g}$ 以上の特定原材料由来タンパク質の混入が認められた試験品については確認試験を行うこととなっている。確認試験法として、小麦、そば、落花生については PCR 法が、卵、乳に関してはウェスタンブロット法が指定されている⁷⁾。

(1) PCR 法によるそばの確認試験

均質化した試料約 2 g を精秤し、CATB 法により DNA を抽出した。PCR 反応には、DNA 抽出の可否を判定するために植物 DNA 増幅プライマーセット (オリエンタル酵母工業 (株) 製) と Ampli Taq Gold (Applied Biosystems 社製) を、また、そば遺伝子確認用プライマーキットとしてオリエンタル酵母工業 (株) 製キットをそれぞれ使用した。標準試料はそば遺伝子確認用キットに付属していたものを用いた。DNA 増幅のための反応液は、最終濃度が $1 \times \text{PCR Buffer}$, $1.5 \mu\text{M MgCl}_2$, $0.2 \mu\text{M dNTPs}$, 0.2nM センスプライマー, 0.2nM アンチセンスプライマー, Ampli Taq Gold 0.625 Units , DNA を小麦の場合 0.1 及び $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, そばの場合 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ となるように調製した。PCR 反応は、 95°C 10 分間保持後、 95°C 30 秒間、 60°C 30 秒間、 72°C 30 秒間を 1 サイクルとして 40 サイクル、最後に 72°C 7 分間の条件で行った。

(2) ウェスタンブロット法による乳、卵の確認試験

卵の確認試験には 2 種のモリナガ卵ウェスタンブロットキット (森永生科学研究所製, オボムコイド及びオボアルブミン用) をそれぞれ使用した。試料溶液は「2. 試料溶液の調製」の項で得られた試料溶液を希釈せずにそのまま用いた。

試料溶液 $100 \mu\text{L}$ にローディングバッファー (和光純薬工業 (株) 製, $\times 2$ 倍濃度を希釈して使用) $200 \mu\text{L}$ を加えて、よく攪拌した後、 100°C で 5 分間加熱した。冷却後その $20 \mu\text{L}$ をテフコ製 15% SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライし、定電流・定電圧電源 (BIOCRAFT (株) 製, BP-550) を用いて 20 mA の定電流で電気泳動 (泳動装置: テフコ (株) 製, STC-808) を行った。泳動後ゲルはアマシャム・バイオサイエンス社製 PVDF 膜 Hybond-P に重層し、転写装置 (テフコ (株) 製 STB-88) を用いて、PVDF 膜 1 cm^2 あたり約 2 mA の電流値で 1 時間転写を行った。転写した PVDF 膜には、モリナガ製ウェスタンブロットキットの 1 次抗体溶液 (終濃度 $0.5 \mu\text{g/mL}$)、2 次抗体溶液 (VECTOR 社製, VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit のビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体を 10,000 倍に希釈したもの)、アルカリホスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液 (VECTOR 社製, VECTASTAIN ABC-AP

Rabbit IgG kit), 検出試薬 (VECTOR 社製 Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV <BCIP/NBT>) を順次反応させ、免疫染色を行った。

同じゲル上に、キットに付属の標準試料溶液 (タンパク質濃度 10 , 1.0 及び $0.5 \mu\text{g/mL}$) をアプライし、同様に操作した後、標準品と同じ分子量位置に明瞭なバンドを認めた場合を「陽性」とした。

結果及び考察

平成 18 年度に検査を実施した 40 検体の試験結果を表 1 に示した。ELISA 法による一次スクリーニング試験の結果、小麦、そば、落花生の検査対象となった 24 検体では、No. 2 の和菓子で小麦タンパクが、また、No. 13 のゆでうどんではそばタンパクがモリナガ、日ハムいずれの ELISA キットでも $10 \mu\text{g/g}$ 以上の値で検出され、小麦及びそばの混入が疑われた。この 2 検体は、PCR 法による確認試験で陽性が確認された。

また、乳及び卵の検査では No. 37 の生そばで卵タンパクがモリナガ、日ハムいずれの ELISA キットでも、 $10 \mu\text{g/g}$ 以上の値で検出され、ウェスタンブロット法による確認試験で卵タンパクの混入が確認された。(表 1)

図 1 及び 2 には PCR 法による小麦及びそば遺伝子の確認試験結果を、また、ウェスタンブロット法による卵タンパクの確認試験結果を図 3 (オボアルブミン) 及び図 4 (オボムコイド) にそれぞれ示した。(図 1~4)

平成 19 年度は表 2 に示した食品 38 検体について検査を行った。小麦、そば、落花生の検査対象である 23 検体の中で、平成 18 年度の検査と同様に、生うどん (No. 15) においてそばタンパクが $10 \mu\text{g/g}$ 以上の値で検出され、PCR 法による確認試験でも陽性となった。図 5 には、No. 15 生うどん中のそば遺伝子の PCR 法による確認試験の結果を示した。(表 2, 図 5)

乳及び卵の検査では、No. 35 の生菓子において、微量 (5.4 及び $7.3 \mu\text{g/g}$) の卵タンパクが検出された。しかし、厚生労働省の通知⁷⁾ では「一次スクリーニング試験の結果が $8 \sim 12 \mu\text{g/g}$ の場合は再試験を行い 2 回の平均値が $10 \mu\text{g/g}$ を超える場合に確認試験を行う」と規定されているので再試験及び確認試験には該当しなかった。

平成 16 及び 17 年度の検査⁸⁾ においては、17 年度の乳、卵のみを通知法⁹⁾ によって検査したが、平成 18 及び 19 年度の検査では、すべての検査を通知法⁹⁾ によって行った。

この通知法⁹⁾ は従前の検査法⁷⁾ とは、試料からのタンパク質の抽出方法が異なっている。Watanabe ら¹⁰⁾ は調理・加工された卵のタンパク質が SDS 及び 2-メルカプトエタノールの添加によって、効率よく抽出されることを報告した。この手法を応用したのが通知法⁹⁾ である。このように、熱変性により不溶化したタンパク質の SDS による可溶化や 2-メルカプトエタノールによる S-S 結合の還元により、サンドイッチ ELISA 法で認識されるタンパク質が効率よく抽出されることが明らかとなった。

表1 平成18年度アレルギー物質モニタリング検査結果

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験 (PCR 法)
			モリナガ	日ハム	
1	魚介乾製品	小 麦	ND	ND	-
2	和菓子	小 麦	18	16	陽性
3	焼菓子	小 麦	0.3	ND	-
4	生菓子	小 麦	ND	ND	-
5	清涼飲料水	小 麦	ND	ND	-
6	清涼飲料水	小 麦	ND	ND	-
7	魚肉練製品	小 麦	0.8	2.1	-
8	ポークソーセージ	小 麦	ND	ND	-
9	生ラーメン	そば	0.8	ND	-
10	生うどん	そば	2.0	1.7	-
11	ゆでうどん	そば	0.6	0.4	-
12	生ラーメン	そば	1.8	0.8	-
13	ゆでうどん	そば	36	21	陽性
14	生ラーメン	そば	1.3	ND	-
15	生うどん	そば	ND	ND	-
16	生ラーメン	そば	0.4	ND	-
17	焼菓子	落花生	ND	ND	-
18	焼菓子	落花生	ND	0.3	-
19	アイスクリーム	落花生	0.4	ND	-
20	生菓子	落花生	ND	0.3	-
21	アイスクリーム	落花生	0.4	ND	-
22	菓子パン	落花生	ND	ND	-
23	アイスクリーム	落花生	ND	ND	-
24	焼菓子	落花生	2.3	1.5	-

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験(ウェスタンブロット法)	
			モリナガ	日ハム	1	2
25	海藻加工品	乳	ND	ND	-	-
26	ポークソーセージ	乳	ND	ND	-	-
27	てんぷら	乳	ND	ND	-	-
28	魚肉練製品	乳	ND	ND	-	-
29	ウインナーソーセージ	乳	ND	ND	-	-
30	肝油加工食品	乳	ND	ND	-	-
31	パン	乳	2.7	2.9	-	-
32	ポークソーセージ	乳	ND	ND	-	-
33	骨付フライドチキン	卵	ND	ND	-	-
34	魚肉練製品	卵	ND	ND	-	-
35	ロースハム	卵	ND	ND	-	-
36	ソーセージ	卵	ND	ND	-	-
37	生そば	卵	14	30	陽性	陽性
38	魚肉練製品	卵	ND	ND	-	-
39	鶏からあげ	卵	ND	ND	-	-
40	魚肉練製品	卵	ND	ND	-	-

ELISA 試験：改良検査法[®]キット(モリナガ FASTPET, 日ハム Ver.II)を使用
 乳の確認試験1：カゼイン, 確認試験2：ラクトグロブリン
 卵の確認試験1：オボアルブミン, 確認試験2：オボムコイド
 ND：0.3 $\mu\text{g/g}$ 未満, -：試験せず。

今回の結果を前報[®]と比較すると、今回初めて、小麦タンパクが10 $\mu\text{g/g}$ 以上の値で検出され、陽性となった。また、そばタンパクは前報[®]と同様に検出されており、10 $\mu\text{g/g}$ 以上の値で検出され、陽性となった製品が平成18及び19年度各1検体ずつあったほか、微量のそばタンパクの混入が疑われるような製品も前報[®]同様に認められた。そばアレルギーは牛乳アレルギーに比較すると重篤な症状を呈する場合が多いこと¹⁾が報告されていることから、混入防止には一層の注意が必要である。

表2 平成19年度アレルギー物質モニタリング検査結果

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験 (PCR 法)
			モリナガ	日ハム	
1	魚肉練製品	小 麦	0.6	ND	-
2	焼菓子	小 麦	5.7	2.6	-
3	漬物	小 麦	ND	ND	-
4	洋生菓子	小 麦	ND	ND	-
5	あん	小 麦	ND	ND	-
6	焼菓子	小 麦	0.9	0.5	-
7	魚肉練製品	小 麦	ND	ND	-
8	魚介乾燥品	小 麦	ND	ND	-
9	生ラーメン	そば	0.4	0.8	-
10	ゆでうどん	そば	3.0	4.8	-
11	生うどん	そば	0.8	1.5	-
12	生うどん	そば	ND	ND	-
13	生ラーメン	そば	ND	ND	-
14	アイスクリーム	そば	ND	ND	-
15	生うどん	そば	19	14	陽性
16	焼菓子	落花生	ND	ND	-
17	焼菓子	落花生	ND	ND	-
18	アイスクリーム	落花生	ND	ND	-
19	焼菓子	落花生	ND	ND	-
20	焼菓子	落花生	ND	ND	-
21	アイスクリーム	落花生	ND	ND	-
22	パン	落花生	ND	ND	-
23	焼菓子	落花生	ND	ND	-

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験(ウェスタンブロット法)	
			モリナガ	日ハム	1	2
24	魚介類加工品	乳	ND	ND	-	-
25	ポークソーセージ	乳	ND	ND	-	-
26	魚肉練製品	乳	ND	ND	-	-
27	ポークソーセージ	乳	ND	ND	-	-
28	魚肉練製品	乳	ND	ND	-	-
29	スナック菓子	乳	ND	ND	-	-
30	焼菓子	乳	ND	ND	-	-
31	てんぷら	乳	ND	ND	-	-
32	和生菓子	卵	ND	0.5	-	-
33	ロースハム	卵	1.2	2.6	-	-
34	ポークソーセージ	卵	ND	ND	-	-
35	生菓子	卵	5.4	7.3	-	-
36	生そば	卵	ND	ND	-	-
37	アイスクリーム	卵	ND	ND	-	-
38	魚肉練製品	卵	0.7	1.1	-	-

ELISA 試験：改良検査法[®]キット(モリナガ FASTPET, 日ハム Ver.II)を使用
 乳の確認試験1：カゼイン, 確認試験2：ラクトグロブリン
 卵の確認試験1：オボアルブミン, 確認試験2：オボムコイド
 ND：0.3 $\mu\text{g/g}$ 未満, -：試験せず。

本報で述べた平成18及び19年度の検査結果では、前報[®]で認められたような製造業者の認識不足による表示義務違反はなく、陽性となった4検体はいずれも検査対象としたそれぞれの特定原材料を含有する製品と同じ製造工程で造られており、製品への混入は製造工程での混入によるものと考えられた。これらのことから、製造工程の分離を行うか、製造工程の十分な洗浄に一層の注意を払う必要があると思われた。また、混入防止の徹底を図ってもなお、その可能性が排除できない場合については注意を喚起する旨の表示を記載することも食物アレルギーによる健康被害を防ぐ上で望ましいといえよう。

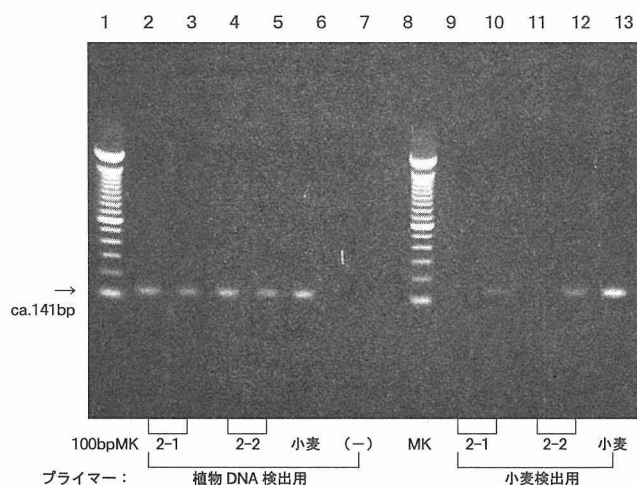


図1 平成18年度試料 No.2 の PCR 法による小麦の確認試験

レーン 1, 8 : 100 bp マーカ、2 : 試料 No.2-1 (サンプル 1) の DNA (0.1 ng/μL) + 植物 DNA 検出用プライマー, 3 : No.2-1 の DNA (10 ng/μL) + 植物 DNA 検出用プライマー, 4 : No.2-2 (サンプル 2) の DNA (0.1 ng/μL) + 植物 DNA 検出用プライマー, 5 : No.2-2 (サンプル 2) の DNA (10 ng/μL) + 植物 DNA 検出用プライマー, 6 : 小麦標準試料の DNA + 植物 DNA 検出用プライマー, 7 : 植物 DNA 検出用プライマーのみ, 9 : No.2-1 の DNA (0.1 ng/μL) + 小麦 DNA 検出用プライマー, 10 : No.2-1 の DNA (10 ng/μL) + 小麦 DNA 検出用プライマー, 11 : No.2-2 の DNA (0.1 ng/μL) + 小麦 DNA 検出用プライマー, 12 : No.2-2 の DNA (10 ng/μL) + 小麦 DNA 検出用プライマー, 13 : 小麦標準試料の DNA + 小麦 DNA 検出用プライマー.

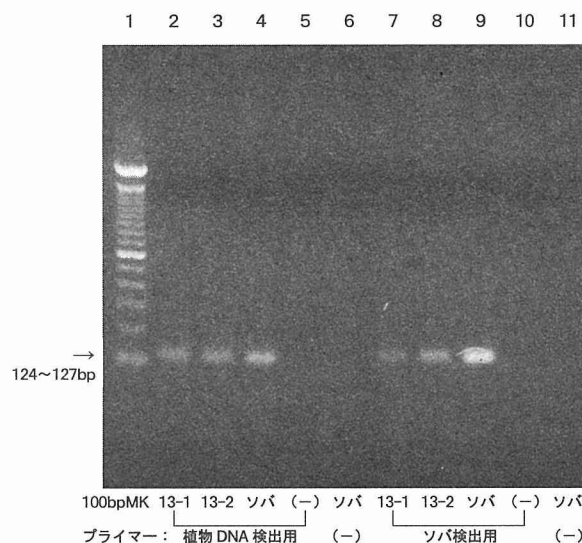


図2 平成18年度試料 No.13の PCR 法によるそばの確認試験

レーン 1 : 100 bp マーカ、2 及び 3 : 試料 No.13-1 (サンプル 1) 及び No.13-2 (サンプル 2) の DNA + 植物 DNA 検出用プライマー, 4 : そば標準試料 DNA + 植物 DNA 検出用プライマー, 5 : 植物 DNA 検出用プライマーのみ, 6 : そば標準試料 DNA のみ, 7 及び 8 : No.13-1 及び No.13-2 の DNA + そば DNA 検出用プライマー, 9 : そば標準試料 DNA + そば DNA 検出用プライマー, 10 : そば DNA 検出用プライマーのみ, 11 : そば標準試料 DNA のみ.

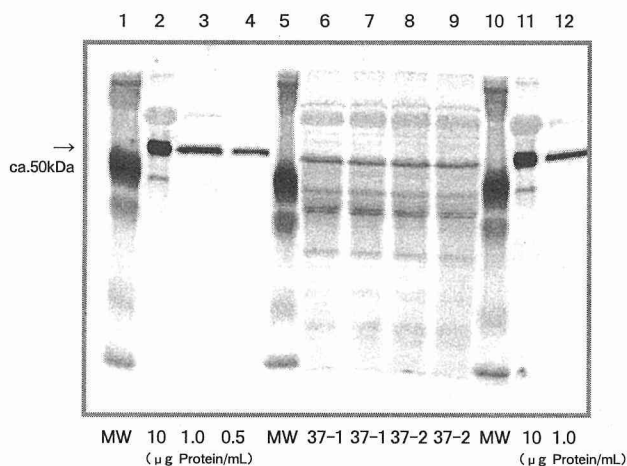


図3 平成18年度試料 No.37のウエスタンブロット法による卵の確認試験(オボアルブミン)

レーン 1, 5 及び 10 : 分子量マーカー (MW), 2 ~ 4 : 卵標準試料 10, 1.0 及び 0.5 μg タンパク/mL (各 20 μL アプライ), 6 及び 7 : 試料 No.37-1 (サンプル 1, 各 20 μL アプライ), 8 及び 9 : 試料 No.37-2 (サンプル 2, 各 20 μL アプライ), 11 及び 12 : 卵標準試料 10 及び 1.0 μg タンパク/mL (各 20 μL アプライ)

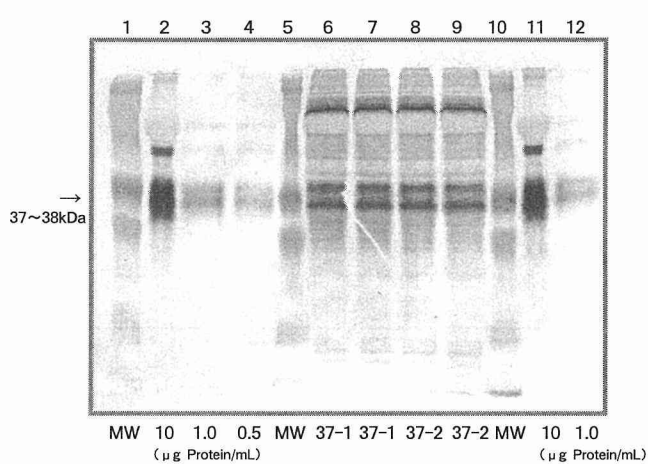


図4 平成18年度試料 No.37のウエスタンブロット法による卵の確認試験(オボムコイド)

レーン 1 ~ 11 : 図 3 に同じ.

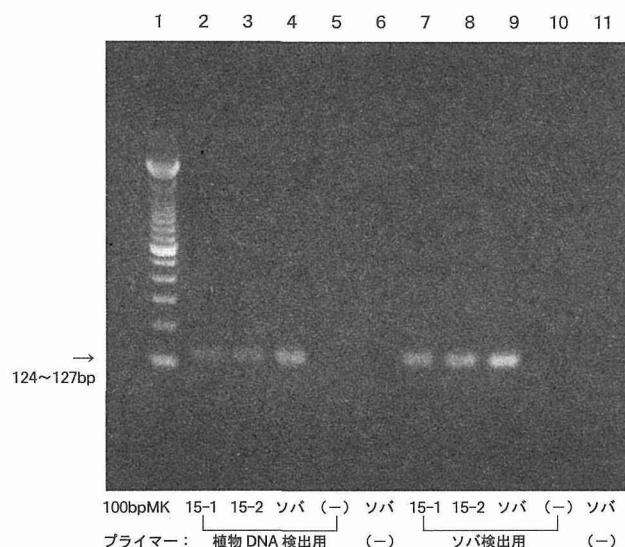


図5 平成19年度試料 No.15の PCR 法によるそばの確認試験

レーン1：100 bp マーカー，2及び3：試料 No.15-1（サンプル1）及び No.15-2（サンプル2）の DNA+植物 DNA 検出用プライマー，4：そば標準試料 DNA+植物 DNA 検出用プライマー，5：植物 DNA 検出用プライマーのみ，6：そば標準試料 DNA のみ，7及び8：No.15-1及び No.15-2 の DNA+そば DNA 検出用プライマー，9：そば標準試料 DNA+そば DNA 検出用プライマー，10：そば DNA 検出用プライマーのみ，11：そば標準試料 DNA のみ。

本モニタリング検査において，試料採取にご協力を頂きました北海道保健福祉部保健医療局食品衛生課及び各支庁保健福祉事務所の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 丸井英二：保健の科学，45，156-160（2003）
- 2) 海老澤元宏：アレルギー，55，107-114（2006）
- 3) 林 隆章：しゃりぱり，288，60-61（2006）
- 4) 池松かおり，田知本寛，杉崎千鶴子，宿谷明紀，海老澤元宏：アレルギー，55，140-150（2006）
- 5) 佐藤千鶴子，斉藤明子，橋本 諭，平川由紀子，大瀬真知子，縄井詠子，安達邦子，澤田扶美代，貝田富子，川田美恵子，我妻義則：道衛研所報，51，32-38（2001）
- 6) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第79号「食品衛生法施行規則及び乳製品の成分規格に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」，平成13年3月15日 (<http://www.hourei.mhlw.go.jp>)
- 7) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第1106001号「アレルギー物質を含む食品の検査法について」，平成14年11月6日 (<http://www.hourei.mhlw.go.jp>)
- 8) 兼俊明夫，林 隆章，田沢悌二郎，加藤芳伸，平間祐志，藤本 啓，斉藤明子，鈴木智宏，孝口裕一，小川 広：道衛研所報，56，61-66（2006）
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食発第1011002号「アレルギー物質を含む食品の検査法について（一部改正）」，平成17年10月11日 (<http://www.hourei.mhlw.go.jp>)
- 10) Watanabe Y, Aburatani K, Mizumura T, Sakai M, Muraoka S, Mamegosi S, Honjoh T：J. Immunol. Methods, 300, 115-123（2005）
- 11) 上野川修一：乳の科学，朝倉書店，東京，2001，p.137